OSTREOPSIS MASCARENENSIS SP. NOV. (DINOPHYCEAE), DINOFLAGELLÉ TOXIQUE ASSOCIÉ À LA CIGUATERA DANS L'OCÉAN INDIEN.

Jean Pascal QUOD

ARVAM
14, rue du stade de l'Est - 97490 Sainte Clotilde
Ile de la Réunion - France.

RÉSUMÉ- Les dinoflagellés tropicaux du genre *Ostreopsis* comportent 4 espèces décrites à ce jour. Une nouvelle espèce potentiellement toxique est présente dans l'archipel des Mascareignes. *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. se distingue des autres Ostreopsidaceae par de très grandes dimensions (diamètre dorso-ventral de 113 à 195 µm), une hypothèque non bombée et une activité natatoire benthique. La cellule posséde deux pusules s'ouvrant dans le sulcus et un pyrénoide rouge en position dorsale. Les détails de l'arrangement des plaques thécales sont présentés. Cette espèce élabore des phycotoxines très actives chez la souris, suggérant un rôle possible dans l'élaboration du complexe toxinique de la ciguatera dans l'océan Indien.

ABSTRACT - *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. is a new toxic species of the ciguatera-associated assemblage of dinoflagellates. Isolated in the Mascareignes archipelago (SW Indian ocean), it differs from the other species of the genus by its morphological and ecological characters, particularly large dorso-ventral size (113-195 µm) and exclusive geotropic swimming. Details of the thecal structure and morphology are presented and discussed. Crude methanol extracts from a natural "bloom" were toxic to mice at doses up to 65 mg/kg. Since this region is the ciguatera endemic area in the South West Indian ocean, attention should be paid to the contribution of these phycotoxins in the regional pattern of ciguatera fish poisoning.

MOTS-CLÉS - Dinoflagellés benthiques, *Ostreopsis*, ciguatera, récifs coralliens, océan Indien.

INTRODUCTION

Les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont des composants benthiques et épiphytiques habituels des écosystèmes coralliens.

Quatre espèces ont été décrites à ce jour: *O. siamensis* Schmidt 1901, *O. lenticularis* Fukuyo 1981, *O. ovata* Fukuyo 1981 et *O. heptagona* Norris 1985. Certaines espèces sont reconnues productrices de phycotoxines (Bomber *et al.*, 1988), et sont à ce titre susceptibles de contribuer significativement avec *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo 1977, *Prorocentrum lima* (Ehr.) Dodge 1975 et *P. concavum* Fukuyo 1981 à l'élaboration du complexe toxinique mis en jeu dans la ciguatera.



Source : MNHN, Paris

Dans l'océan Indien, le cortège de dinoflagellés ciguatérigènes associés à la ciguatera inclut les espèces généralement décrites dans les autres régions tropicales et subtropicales (Quod *et al.*, 1994). Elles appartiennent aux genres *Prorocentrum*, *Ostreopsis*, *Coolia*, *Gambierdiscus*, *Scripsiella*, *Synophysis* et *Amphidinium*. Des peuplements épiphytiques importants de représentants du genre *Ostreopsis* sont parfois observés dans les secteurs récifaux à fort hydrodynamisme.

Nous décrivons ici une nouvelle espèce toxino-productrice, de grande taille et rencontrée dans l'archipel des Mascareignes (Sud Ouest de l'océan Indien), région d'endémicité ciguatérique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des prélèvements algaux ont été effectués en novembre 1992 et juin 1993 dans le complexe récifo-lagonaire des diverses îles des Mascareignes (Réunion, Maurice, Rodrigues), dans le cadre d'une étude globale sur la communauté des dinoflagellés benthiques récifaux du Sud-Ouest de l'océan Indien. Le matériel biologique a été prélevé en apnée ou en scaphandre autonome, filtré au travers de tamis de 850, 250 et 38 µm, puis conservé dans de l'eau de mer formolée à 10 %.

Les échantillons destinés à la culture cellulaire sont maintenus à température ambiante jusqu'au laboratoire. Après isolement et rinçages successifs des cellules en milieu stérile, celles-ci sont transférées dans le milieu de culture modifié MPP de Provasoli & Pintner (Provasoli, 1970). Les cellules vivantes ou conservées sont ultérieurement observées au microscope photonique (CARL ZEISS). Les dimensions cellulaires sont mesurées au moyen d'un micromètre oculaire. L'analyse de l'arrangement des plaques thécales a été effectuée par observations au microscope optique et électronique des plaques ou des fragments de plaque.

L'étude toxicologique présentée ici a été menée à partir d'une collecte unique d'un «bloom» épiphytique d'*Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. observé sur des algues macrophytes (*Galaxaura* sp.) en juin 1993. Après détermination de la densité en dinoflagellés et filtration de l'échantillon, celui-ci est conservé à -20° C dans du méthanol. La fraction soluble dans le méthanol est utilisée comme source de l'extrait brut toxique. La procédure de purification ultérieure, précédemment décrite (Quod *et al.*, 1994), consiste en une succession de solubilisations sélectives de l'extrait brut dans divers solvants organiques. Les extraits ainsi obtenus sont mis en suspension dans une solution physiologique à 1 % de Tween 60 (polyoxyéthylène sorbitan monostéarate). Les tests de toxicité aiguë ont été effectués sur des souris de 18 à 20 grammes. Après administration par voie intrapéritonéale, la symptomatologie développée ainsi que le temps de survie sont notés. La DLM (Dose Létale Minimale) est définie comme étant la dose d'extrait la plus faible, rapportée à un gramme de l'animal, capable de tuer une souris entre 6 et 24 heures.

RÉSULTATS

Description générale
Division: Pyrrhophyta Pasher

Source : MNHN, Paris

Classe: Dinophyceae Pasher
Ordre: Peridiniales Lindemann
Famille: Ostreopsidaceae Lindemann
Genre: *Ostreopsis* Schmidt

Ostreopsis mascarenensis sp. nov. Quod (figure 1).

Organismus photosyntheticus. Dinoflagellatum armatum magnum. Cellulae ovale (Longitudo dorso-ventralis 113-195 µm; 25-30 µm longae et 79-138 µm latae). Pyrenoideus in regione dorsale cellulae. Epitheca atque hypotheca aequabilis. Thecae laeves areolis numerosis.

Habitatio: marina; cellulae in loco Saint Leu, Réunion insulae.

Iconotypus: figura nostra 1

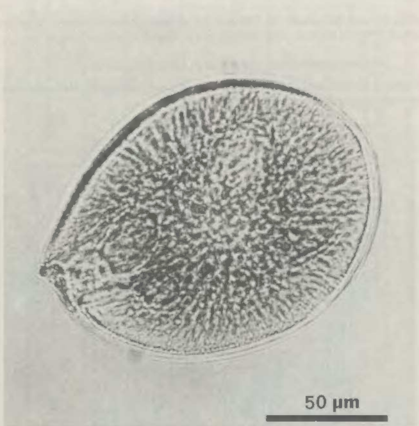


Figure 1: Vue apicale de *O. mascarenensis* sp. nov.

Source : MNHN, Paris

Au sein du genre *Ostreopsis*, les critères de différenciation sont surtout basés sur les caractéristiques morphologiques: forme et taille (Fukuyo, 1981).

Ostreopsis mascarenensis sp. nov. est un dinoflagellé benthique photosynthétique de grande taille (diamètre dorso-ventral moyen de 148 µm). Sa forme est globalement ovale, à l'exception du sulcus qui présente quelques indentations (figure 1).

Ses dimensions sont présentées dans le tableau I. Comparées aux autres représentants du genre, elles démontrent que *O. mascarenensis* est la plus grande espèce décrite du genre *Ostreopsis*.

Observées au faible grossissement, les thèques supérieure et inférieure ont sensiblement la même taille et le pore apical (Po) peut être aisément distingué en vue apicale. En vue latérale, on observe une originalité au sein de ce groupe. Les thèques ont une forme différente, l'hypothèque apparaissant non bombée (figure 2c).

La structure cytoplasmique fait apparaître un matériel peu dense, du fait de la faible longueur des cellules (25 à 30 µm). Les chromatophores, de couleur jaune brun, sont en forme de bâtonnets et se raréfient vers la périphérie cellulaire (figure 1).

Plusieurs structures sont observables au faible grossissement:

1/- dans la partie ventrale, 1 ou 2 pusules plus ou moins développées, de forme ovale et semblant s'ouvrir dans le sulcus;

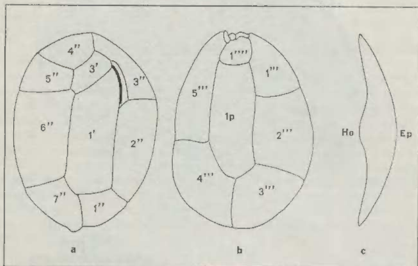


Figure 2: Morphologie générale et arrangement des plaques thécales. a) Vue apicale de l'épithèque (Ep). b) Vue antapicale de l'hypothèque. (Ho). c) Coupe optique.

Source : MNHN, Paris

espèce	diamètre dorsoventral D (µm)	diamètre transversal T (µm)	rapport D/T	longueur (µm)	toxicité	Référence
Ostreopsis mascarenensis (a) (b)	148 ± 19,3 (113-195)	103 ± 11,6 (79-138)	1,43	25 à 30	toxique	
Ostreopsis heptagona	108 (96-122)	70 (62-84)	2,5 à 3	59 (48-70)	toxique	NORRIS et al., 1985
Ostreopsis lenticularis	61 (49-69)	41 (35-51)	1,49			FUKUYO, 1981
	63 (49-75)	45 (37-53)	1,4	33 (26-41)	toxique	TINDALL et al., 1990
Ostreopsis siamensis	(60-100) 102 ± 7,7 (88-115)	(45-90) 76 ± 9,2 (64-93)	 1,4 ± 0,1	 27 ± 3,8 (22-36)	 toxique	FUKUYO, 1981 HOLMES et al., 1988 TOSTESON et al., 1986
Ostreopsis ovata	(50-56) 51 (39-55) 43(33-51)	(25-35) 32(26-35) 31(26-33)	 1,59 1,39	 25(22-26) 26(25-28)	atoxique	FUKUYO, 1981 TINDALL et al., 1990 TINDALL et al., 1990

Tableau I: Principales caractéristiques morphologiques des dinoflagellés du genre *Ostreopsis*. (a): moyenne ± erreur standard. (b): étendue.

Source : MNHN, Paris

2/- un pyrénoide rouge, parfois présent dans la région dorsale et à proximité du pore apical.

Arrangement des plaques thécales

La thèque est constituée de plaques de tailles et formes inégales, délimitées par un réseau de bandes intercalaires. La surface thécale est lisse et couverte de pores (figure 3) visibles en microscopie photonique. L'observation au microscope à balayage révèle la présence de légères dépressions, de forme ronde ou ovale. En grand nombre et de taille peu différente (1 à 1,2 µm de diamètre), elles sont constituées en leur centre d'un ou plusieurs pores de taille variable (0,2 à 0,4 µm) (figure 3b).

La disposition des plaques thécales est présentée dans la figure 2. Celles-ci sont codées selon la notation conventionnelle de Kofoid (Steidinger, 1979). Compte tenu de leur petite taille, il n'a été possible de caractériser ni les plaques sulcales, ni les plaques cingulaires.

L'épithèque est composée de 10 plaques (figure 2a). Une plaque apicale centrale (1') et de grande taille jouxte le pore apical. Ce dernier est de grande dimension (26 µm) et légèrement courbe (figure 3a). Pour *O. heptagona* et *O. ovata*, sa longueur serait respectivement de 8-9 µm (Norris *et al.*, 1985) et 6-7 µm (Besada *et al.*, 1982). Par sa position, il s'apparente donc à *O. siamensis, O. lenticularis* et *O. ovata* et diffère de *O. heptagona*.

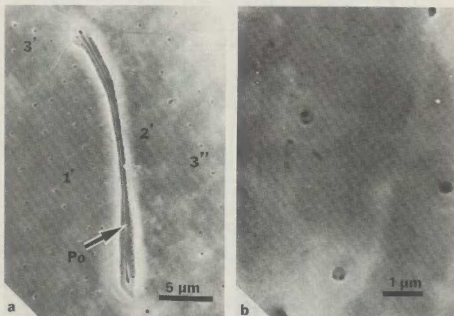


Figure 3: a) Détail de la région du pore apical (Po). b) Détail de l'ornementation thécale: légères dépressions présentant un ou plusieurs pores.

Source : MNHN, Paris

L'hypothèque a une structure plus complexe. Sept plaques peuvent être aisément identifiées (figure 2b).

Une grande plaque pentagonale antapicale (notée 1p) présente un allongement dorso-ventral. Sa longueur est de 102 µm et sa largeur de 40 µm (rapport de 2,55).

Écologie et distribution

Ostreopsis mascarenensis sp nov. est un dinoflagellé photosynthétique. Il a été préférentiellement retrouvé en arrière des récifs barrière entre 2 et 5 mètres de profondeur, en situation épiphytique sur les macroalgues rouges et brunes plutôt que sur les sédiments ou les coraux nécrosés. Il coexiste avec d'autres dinoflagellés, en particulier *Gambierdiscus toxicus* et *Ostreopsis ovata*. Il peut former des «blooms» épiphytiques avec des densités supérieures à 10 000 cellules par gramme d'algues support, et constitue alors l'espèce épiphyte quasi-exclusive qui recouvre les macroalgues.

En culture, les cellules se déplacent essentiellement sur le fond par à-coups successifs. Les flagelles demeurent non visibles en microscopie photonique, contrairement aux observations effectuées pour *O. siamensis* et *O. lenticularis*. On note une déformation progressive des lignées de cellules. Les contours deviennent irréguliers et la partie dorsale pointue, suggérant une inadaptation au milieu de Provasoli et Pintner.

Toxicologie

L'injection chez l'animal de doses croissantes d'extrait brut méthanolique entraîne l'apparition d'une symptomatologie révélatrice d'une atteinte nerveuse ainsi que le décès rapide des souris aux doses supérieures testées (tableau IIa).

Une purification partielle de l'extrait brut met en évidence l'existence de plusieurs fractions toxiques hydro et liposolubles (tableau IIb).

DISCUSSION

Le genre *Ostreopsis* comportait 4 espèces pour lesquelles la classification repose sur les caractères morphologiques. Une nouvelle espèce, *O. labens* sp. nov. a été récemment observée en Floride (Faust, en soumission). Il existe en outre un dinoflagellé récifal morphologiquement apparenté à *Ostreopsis*: *Coolia monotis* Meunier (Faust, 1992).

Nos observations révèlent un certain nombre de caractères morphologiques et écologiques qui distinguent *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. des autres représentants actuels du genre:

1/- *O. mascarenensis* sp. nov. s'avère le plus grand et le moins bombé des *Ostreopsis*, en relation avec son caractère benthique. Cette grande taille se retrouve au niveau de la plaque 1'''', dont le rapport longueur / largeur est de 2,55. Chez *O. siamensis*, ce ratio est de 1,6 (Holmes *et al.*, 1988).

2/- le pore apical (Po) est considérablement plus grand que chez *O. heptagona*, autre espèce de grande taille (longueurs respectives de 26 et 8-9 µm);

Source : MNHN, Paris

(a) :

TESTS EFFECTUES AVEC L'EXTRAIT BRUT METHANOLIQUE

poids spécifique mg/10^6 cellules	symptomatologie développée chez la souris	
	doses aigues (65 mg/kg à [redacted] mg/kg)	doses subaigues (< à 65 mg/kg)
35,3	incapacité motrice puis paralysie, diarrhées décès entre 20 et 60 minutes	diarrhées ataxie lacrymation piloérection

(b) :

PURIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT / DETERMINATION DES FRACTIONS TOXIQUES

EXTRAIT BRUT METHANOLIQUE
(20,5 mg)

FRACTION MÉTHANOL	FRACTION HEXANE	FRACTION AQUEUSE	FRACTION BUTANOL
(9 mg)	(3,5 mg)	(3,8 mg)	(4,2 mg)
toxique	atoxique	toxique	toxique
DLM= 63 mg. kg^{-1}		DLM [redacted] déterminée	DLM [redacted] déterminée

Tableau II: Toxicité expérimentale de *O. mascarenensis* sp. nov. sauvage. (a): tests réalisés avec l'extrait brut méthanolique; (b): purification et détermination des fractions toxiques.

3/- l'arrangement des plaques thécales est similaire à celui décrit pour les espèces *O. siamensis*, *O. ovata* et *O. lenticularis* (Fukuyo, 1981; Holmes *et al.*, 1985) mais diffère de *O. heptagona* (Norris *et al.* , 1985). Chez ce dernier, la plaque 5'' est en contact avec 1'.

4/- contrairement aux autres Ostreopsidaceae qui ont une activité natatoire avec rotation autour de l'axe dorso-ventral, cette espèce qui est dotée d'une hypothèque moins bombée que l'épithèque, se déplace en culture sur le fond et n'est que rarement observée en eau libre.

Sur la base des observations présentées et des comparaisons effectuées avec les autres représentants du genre *Ostreopsis*, il est possible de conclure que *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. est une nouvelle espèce de dinoflagellé benthique en milieu corallien. C'est également le plus grand représentant de la famille. En milieu naturel, il peut constituer de véritables «blooms» épiphytiques associés aux algues macrophytes.

Les espèces toxiques du genre *Ostreopsis* élaborent des toxines hydrosolubles aux activités voisines de la maïtotoxine produite par *Gambierdiscus toxicus* (Bomber *et*

Source : MNHN, Paris

al., 1988; Tindall *et al.*, 1990). Les résultats préliminaires de notre étude confirment la toxicité potentielle de cette nouvelle espèce. Des travaux complémentaires demeurent à réaliser pour d'une part, caractériser le nombre et la nature des phycotoxines élaborées et, d'autre part, préciser la place de ce dinoflagellé dans le processus biomarin de la ciguatera.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à A. Sournia pour ses précieux conseils ainsi qu'à J. Truslé pour les travaux de microscopie électronique.

Cette étude a été financée par le Conseil Général de la Réunion ainsi que par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (aide 92.Y.0043).

RÉFÉRENCES

BESADA E.G., LOEBLICH L.A. & LOEBLICH A.R., 1982 - Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera endemic areas: *Coolia, Gambierdiscus* and *Ostreopsis*. *Bull. Mar. Sci.* 32: 723-735.

BOMBER J.W. & AIKMAN K.E., 1988 - The ciguatera dinoflagellates. *Biol. Oceanography* 6: 291-311.

FAUST M.A., 1992 - Observations on the morphology and sexual reproduction of *Coolia monotis* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 28: 94-104.

FAUST M.A., - Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *J. Phycol.*, en soumission

FUKUYO Y., 1981 - Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47: 967-978.

HOLMES M.J., GILLESPIE N.C. & LEWIS R.J., 1988 - Toxicity and morphology of *Ostreopsis* cf. *siamensis* cultured from a ciguatera endemic region of Queensland, Australia. *In* CHOAT *et al.* (Eds). *Proc. Sixth Int. Coral Reef Symp.*, Townsville, pp. 49-54.

NORRIS D.R., BOMBER J.W. & BALECH E., 1985 - Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida keys. I *Ostreopsis heptagona* sp nov. *In* ANDERSON *et al.* (Eds). *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier Science Publ. Co., New York, pp. 39-44.

PROVASOLI L.,1970 - Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Ann. Rev. Microb.* 12: 279-308.

QUOD J.P., TURQUET J., DIOGENE G. & FESSARD V., 1994 - Screening of extracts of dinoflagellates from coral reefs (Réunion island, SW Indian Ocean), and their biological activities. *In* LASSUS P. (Eds). *Toxic Marine Phytoplankton*, in press.

STEIDINGER K.A., 1979 - Collection, enumeration and identification of free-living marine dinoflagellates. *In* TAYLOR *et al.* (Eds). *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier North Holland, pp. 435-442.

TINDALL D.R., MILLER D.M., & TINDALL P.M.,1990 - Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the Britsh and United States Virgin Islands. *In* GRANÉLI E. *et al.* (Eds). *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier Science Publ. Co., pp. 424-429.

TOSTESON T.R., BALLANTINE D.L., TOSTESON C.G., BARDALES A.T., DURST H.D., HIGERD T.B., 1986 - Comparative toxicity of *Gambierdiscus toxicus, Ostreopsis* cf. *lenticularis*, and associated microflora. *Mar. Fish. Rev.* 48: 57-59.

Source : MNHN, Paris